

UPLOAD

2015 September **VOL. 103**

Brand-New item

- 1 マルチプレックスPCR・バイサルファイト処理DNA用 高正確性PCR酵素
KOD -Multi & Epi-™ **キャンペーン**

HOT ITEM

- 5 高効率リアルタイムPCR用マスターミックス
KOD SYBR® qPCR Mix

TECHNICAL REVIEW

- 7 KOD SYBR® qPCR Mixを用いた長鎖配列を標的とした
リアルタイムPCR-RNAi組換え体におけるインタクトなmRNAの
正確な定量への活用

USER'S NOTE

- 9 製品KOD SYBR® qPCR Mixを用いた実施例
ChIPターゲットの効果的な増幅

FLASH NEWS

- 10 TOYOBO LIFE SCIENCEウェブサイトリニューアルの
お知らせ
10 Santa Cruz Biotechnology
CRISPR/Cas9 System

HOT ITEM

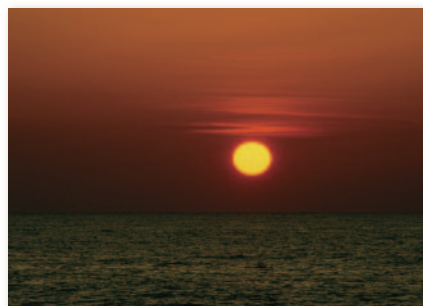
- 11 高効率・高成功率PCR酵素
KOD FX Neo

TECHNICAL REVIEW

- 13 高成功率PCR酵素「KOD FXシリーズ」を用いた
植物種子からの簡便な増幅例



KOD -Multi & Epi-™
→本誌p.1~4に詳細記事がございます。



マルチプレックスPCR・バイサルファイト処理DNA用 高正確性PCR酵素 KOD -Multi & Epi-™



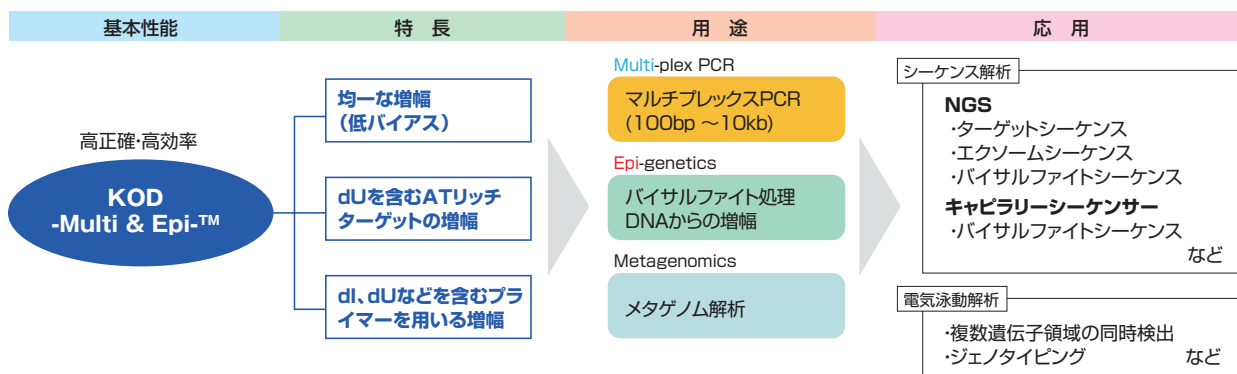
NEW

■期間：2015年9月7日～2016年3月18日（ご注文分）

特異的かつ均一なマルチプレックスPCRおよびバイサルファイト処理DNAの増幅に最適

KOD -Multi & Epi-™ は、遺伝子改変型KOD DNA ポリメラーゼ（UKOD）を用いて開発された高正確性PCR用酵素です。改変により、今まで困難だったウラシルを多く含む鋳型やイノシンを含むプライマーなどを用いることができるようになりました。更に、伸長アクセラレーター等の添加により、伸長性が向上することで配列や増幅サイズなどによる増幅バイアスを受けにくくなりました。

よって、KOD -Multi & Epi-™は、マルチプレックスPCRやバイサルファイト処理後のDNAの増幅（エビジェネティクス解析）、メタゲノム解析など様々な用途に用いることが可能です。また、本酵素はTaqポリメラーゼの約11倍の正確性を示すため、得られた増幅産物はクローニングを介した従来のシーケンス解析や次世代シーケンスなどに幅広く用いることが可能です。



特長1 均一な増幅（低バイアス）

1kb以下の短鎖のターゲットから10kb前後の長鎖のターゲットまでの幅広い範囲で特異的かつ均一なマルチプレックスPCRを行うことができます。GCの偏りによる増幅への影響を最小限に抑えており、ゲノムやトランスクリプトームの様々な領域を均一に増幅することが可能です。

この特性を生かし、次世代シーケンサー解析に使用する増幅産物の調製にも使用することができます。

特長2 ウラシルを多く含むDNAからの増幅

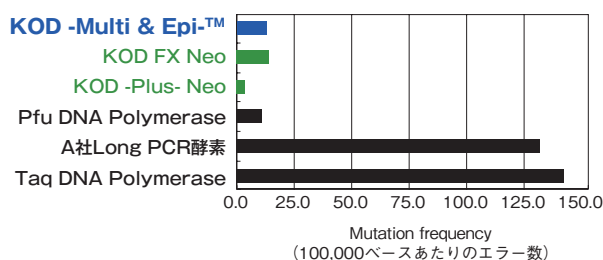
バイサルファイト処理後のウラシルを多く含むDNAから高い効率で増幅を行うことができます。最大で約1.5kbの増幅を確認しています。

特長3 イノシンやウラシルを含むプライマーに対応

従来の高正確性PCR酵素では、イノシンやウラシルを含むプライマーを用いる解析が困難でしたが、KOD -Multi & Epi-™ はそれらのプライマーを用いて解析することができます。

特長4 高正確性

Taqポリメラーゼの約11倍の正確性（KOD FX Neoと同等）を示し、増幅産物を様々な用途に用いることができます。



*PCRエラー率は、各酵素にてヒトゲノムDNAを鋳型にβ-globin遺伝子（2.4kb）の増幅を行い、PCR産物をTAクローニング後、96 クローンをシーケンシング解析し、測定しました。

特長5 クールドサンプルに対応

クールドサンプルの影響を受けにくく、血液検体を用いたマルチプレックスPCRの他、動植物のライセートからのジェノタイピングや土壌、食品サンプルなどからの増幅などにも用いることが可能です。

特長6 高効率

伸長アクセラレーターを添加することでPCR効率が向上し、シングルプレックスPCRでは伸長時間を最短で15sec./kbまで短縮することが可能です。

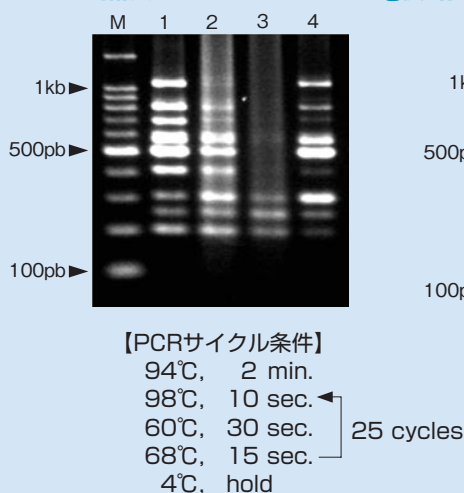
※クールドサンプルやバイサルファイト処理を行ったDNAサンプルを用いる場合や長鎖のマルチプレックスPCRを行う場合は、効率を優先するため30～60sec./kbを推奨する場合があります。詳しくは取扱説明書をご覧ください。

実施例1 マルチプレックスPCR性能比較

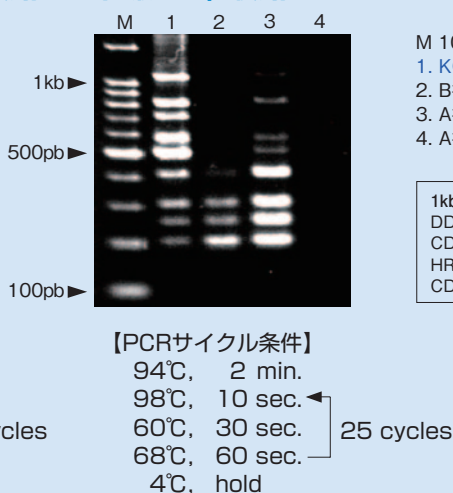
精製したヒトゲノムDNAおよび血液サンプルを用いて、1kb以下、および1～10kbの複数のターゲットを様々なPCR酵素でマルチプレックスPCRを行い性能を比較しました(50μl反応系)。その結果、KOD -Multi & Epi-™を用いた場合のみ、すべての条件でバイアスの少ない良好な結果を得ることができました。KOD -Multi & Epi-™は、血液成分の障害をうけにくく、精製ゲノムDNAからの増幅と同様にバイアスの少ない増幅結果を示しました。

マルチプレックスPCR (短鎖: 1kb以下)

●精製ゲノムDNA (精製ヒトゲノムDNA 50ng使用)



●血液サンプル (血液 2.5μl使用)

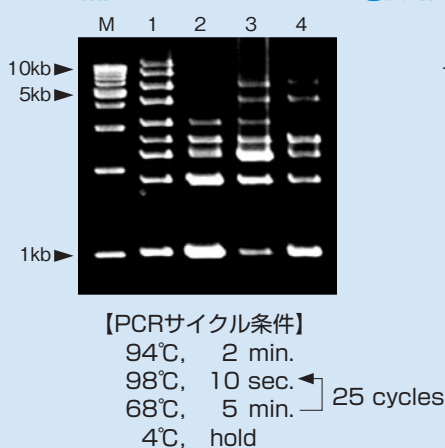


M 100bp DNA Ladder
1. KOD -Multi & Epi-™
2. B社Multiplex PCR酵素
3. A社Taq系PCR酵素
4. A社Long PCR酵素

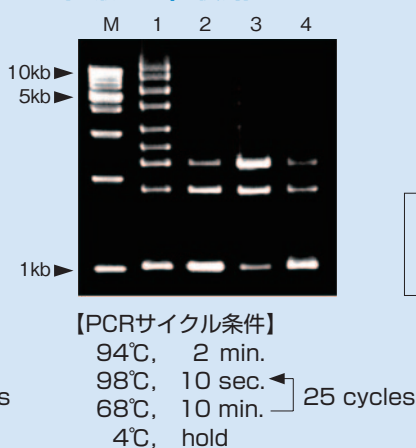
1kb以下ターゲット (増幅長)
DDB2 (200 bp), FANCG (250 bp), HBg (300 bp),
CDH1 (400 bp), chromosome9 (500 bp), ERCC4 (550 bp),
HRAS (600 bp), PRF1 (700 bp), BRCA1 (800 bp),
CDK4 (1,000 bp)

マルチプレックスPCR (長鎖: 1～10kb)

●精製ゲノムDNA (精製ヒトゲノムDNA 50ng使用)



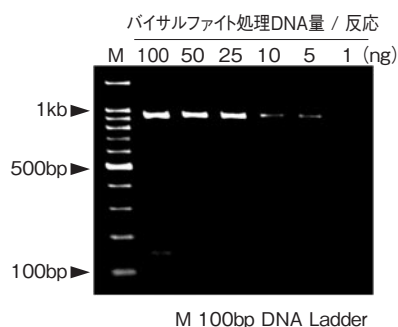
●血液サンプル (血液 2.5μl使用)



M 1kb DNA Ladder
1. KOD -Multi & Epi-™
2. C社Multiplex PCR酵素
3. D社高正確性PCR酵素
4. A社高正確性PCR酵素

1～10kbターゲット (増幅長) <ガン関連遺伝子>
Chromosome9 (1 kb), MSH6 (1.8 kb), BRCA2 (2.3 kb),
WT-1 (2.5 kb), FANCG (3 kb), RAD51 D (4 kb),
KRAS (5 kb), BRCA1 (7 kb), DDB2 (10 kb)

また、TGF β (917bp)について、テンプレート量の検討を行いました。その結果、5ngまで検出することが可能でした。バイサルファイト処理を行うことにより、DNAが断片化されることが知られていますが、そのようなサンプルを用いた場合においても、KOD -Multi & Epi-TMを用いて約1kbのターゲットを高感度で検出することが可能でした。



【バイサルファイト処理方法】
EpiTect[®] Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN)

【PCRサイクル条件】
94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ← 40 cycles
60℃, 30 sec.
68℃, 30 sec.
4℃, hold

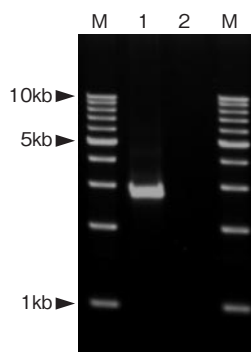
実施例4 イノシンを含むプライマーを用いた増幅効率比較

イノシンを含む縮重プライマーを*E. coli*のDNA ポリメラーゼ I のアミノ酸配列から設計し、KOD -Multi & Epi-TMとKOD-Plus- ver.2 (従来品) で増幅を行いました。その結果、KOD -Multi & Epi-TMを用いることで、従来のKOD DNAポリメラーゼ等の高正確性PCR酵素では使用できなかったイノシンを含む縮重プライマーで増幅することができました。同様にウラシルを含むプライマーを用いる増幅も可能です。

【Template】
E. coli ゲノムDNA 100ng

【プライマー配列】
DNA ポリメラーゼ I (2.8kb)
Primer F : ATGGTICARATHCCICARAAY
Primer R : RTGIGCYTGRTCCCATTTTC

【PCRサイクル条件】
94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ← 35 cycles
60℃, 30 sec.
68℃, 45 sec.
4℃, hold



M 1kb DNA Ladder
1. KOD -Multi & Epi-TM
2. KOD -Plus- Ver.2 (従来品)

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
マルチプレックスPCR・バイサルファイト処理DNA用高正確性PCR酵素 KOD -Multi & Epi-TM ・KOD -Multi & Epi- TM (1.0U/μl) ・2×PCR Buffer for KOD -Multi & Epi- TM	200U×1本 [200回用]*	-20℃	KME-101	¥35,000	¥21,000

*50μl反応を行った時の反応回数で表示しています。

※2×PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-TMにはdNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) およびMg²⁺ (終濃度2.0mM) が含まれています。

関連商品

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率TAクローニングキット (KOD用) TARget CloneTM -Plus-	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000

KOD -Multi & Epi-TMによって増幅されたDNAの末端は平滑化されていますので、末端を制限酵素処理するか、平滑末端クローニングの手法を用いてクローニングを行う必要があります。また専用のTAクローニングキット「TARget CloneTM -Plus- (Code No. TAK-201)」を用いることで増幅産物に直接Aを付加し、そのまま容易にTAクローニングを行うことができます。

高効率リアルタイムPCR用マスターミックス

KOD SYBR® qPCR Mix

GCリッチ等の難配列の増幅に最適。今まで設計したプライマーを使用可能。

KOD SYBR® qPCR Mixは、KOD DNA polymerase (KOD) を使用したSYBR® Green I 検出系によるリアルタイムPCR用マスターミックスです。3'→5'エキソヌクレアーゼ活性(校正活性)を除去したKOD exo(-) DNA polymeraseと最適化されたバッファー条件を組み合わせることで、KODの『優れた合成能』や『クルード成分の阻害を受けにくい』という性質を最大限に発揮し、安定したリアルタイムPCR解析が可能になりました。



特長1 長鎖ターゲットの増幅が可能(～2kb)

KOD DNA Polymeraseの特長を活かして長鎖ターゲット増幅での定量性に優れます。プライマーの選択幅が格段に広がり、2kbまでのターゲットであれば、多くの場合今まで設計したプライマーをそのまま用いることも可能です。

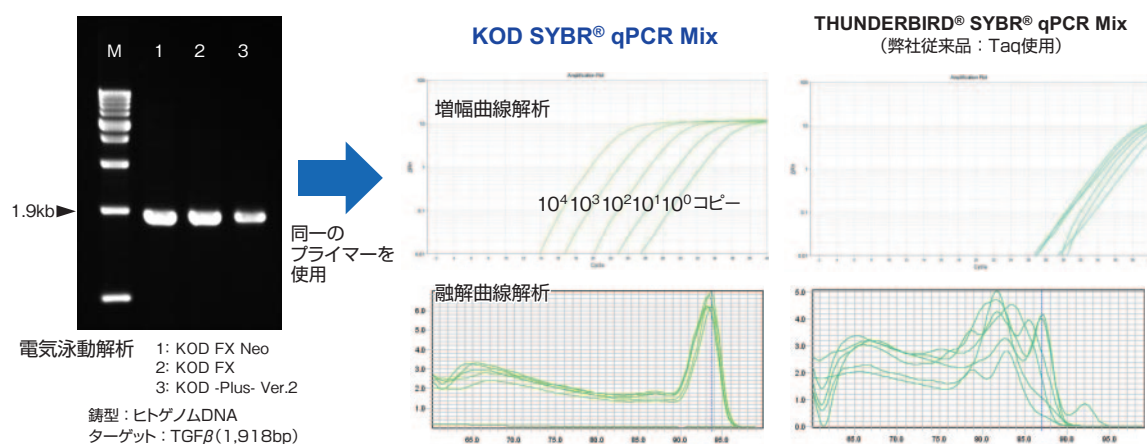


図1. 長鎖ターゲットに対するリアルタイムPCR (ABI StepOnePlus™使用)

KOD FXシリーズやKOD-Plus-シリーズで増幅可能なプライマーを用い、約2kbのターゲットの増幅を実施しました。その結果、Taq DNA polymeraseを用いる従来品では増幅困難な約2kbのターゲットでも本製品では定量的な増幅が認められました。

また、2kbまでの様々なターゲット長を選択できるため、幅広い融解曲線解析が可能です。プライマーダイマーの発生領域(短鎖領域)を外して増幅領域を選べるため、エンドポイントアッセイを用いる多型解析、マルチプレックスPCR解析などに有利です。

特長2 GCリッチターゲットに対応

KOD DNA polymeraseを使用することで、Taq DNA polymeraseを用いる従来品では困難であった塩基に偏りがあるような配列やプロモーター近傍の2次構造をとりやすいようなターゲットにおいても、定量的な増幅が認められます。

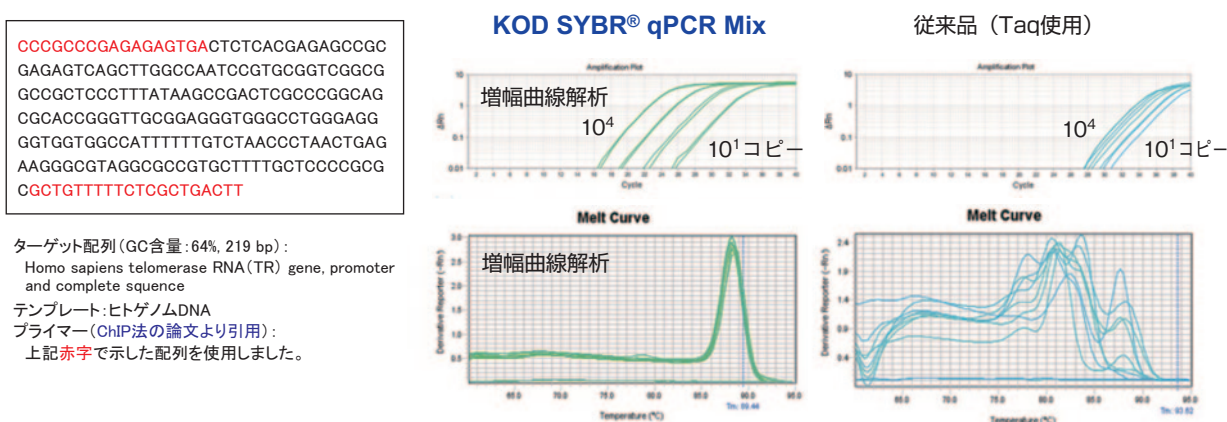


図2. ヒトテロメラーゼRNA (TR) のプロモーター領域の増幅

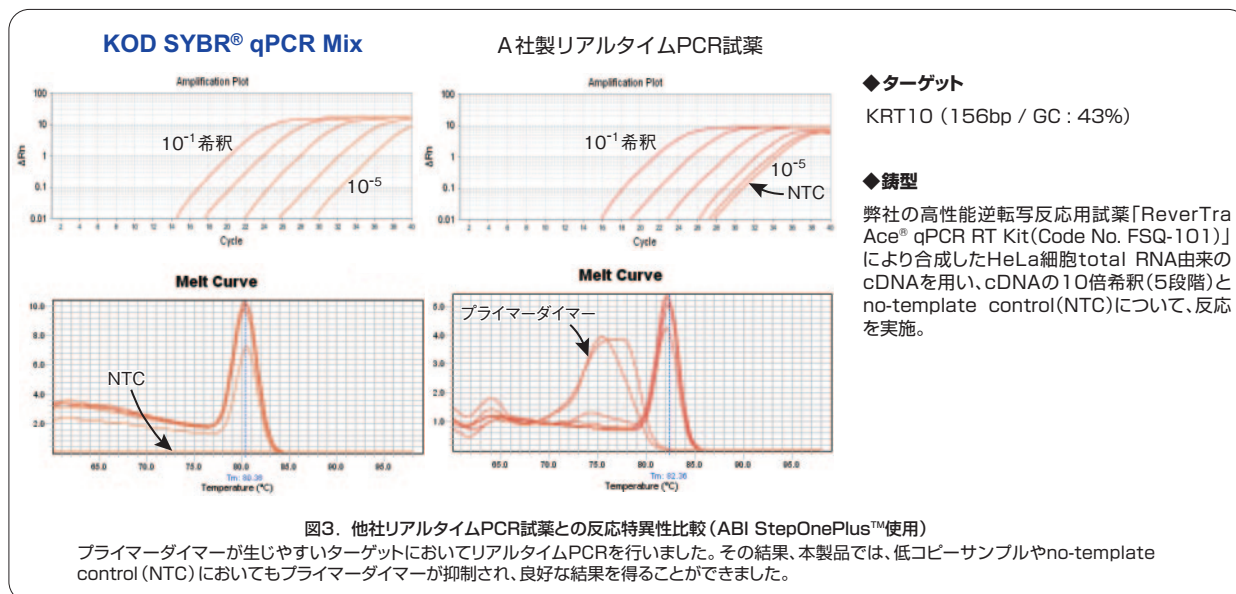
典型的なCpGアイランドを含むヒトテロメラーゼRNA (TR) のプロモーター領域を増幅しました。従来のTaq DNA polymeraseを用いたqPCR試薬ではプライマーダイマーと思われる増幅しか認められませんでした。KOD SYBR® qPCR Mixを用いた場合は鋳型DNA量に依存した増幅が認められました。

特長3 クールドサンプルを用いる解析が可能

クールド成分による阻害を受けにくいため、血液やマウステール、植物ライセート等を用いるアッセイが可能です。長鎖増幅やTail配列を付加したプライマーを用いる増幅によるジェノタイピング解析等に应用することができます。

特長4 高い特異性

プライマーダイマーなどの非特異的反応を抑えることで、低コピー域までの幅広い定量を可能とします。また、弊社リアルタイムPCR用cDNA合成キット「ReverTra Ace® qPCR RTシリーズ」を併用することで安定した検出が得られます。



特長5 様々な機器に対応

ブロックタイプの機器 (Fast Modelにも対応) のほか、ガラスキャピラリーを用いる高速サイクラーにも対応しています。また、50×ROX reference dyeが別添付されているため、パッシブリファレンスを必要とする機器においても、各機器に適したROX濃度でご使用頂けます。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD SYBR® qPCR Mix ・KOD SYBR® qPCR Mix ・50×ROX reference dye	1ml×1本 [40回用]	-20℃	QKD-201T	¥9,800
	1.67ml×3本 [200回用]	-20℃	QKD-201	¥32,000
	(1.67ml×3本)×5 [1,000回用]	-20℃	QKD-201X5	¥147,000

※50×ROX reference dyeがマスターミックスとは、別添付されています。
 ※包装欄に記載の反応回数は、50μl反応時のものです。容量は、KOD SYBR® qPCR Mixのみ示しています。
 ※SYBR®は、Molecular Probes Inc.の登録商標です。

関連商品

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
リアルタイムPCR用cDNA合成キット ReverTra Ace® qPCR RT Kit	200回用	-20℃	FSQ-101	¥38,000
リアルタイムPCR用cDNA合成キット 完全プレミックスタイプ ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	200回用	-20℃	FSQ-201	¥38,000
リアルタイムPCR用cDNA合成キット 完全プレミックスタイプ (ゲノムDNA除去試薬付き) ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	200回用	-20℃	FSQ-301	¥40,000

※包装欄に記載の反応回数は、10μl反応時のものです。

KOD SYBR® qPCR Mixを用いた長鎖配列を標的としたリアルタイムPCR —RNAi組換え体におけるインタクトなmRNAの正確な定量への活用

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品バイオテクノロジー研究領域
伊藤 康博・嶋 羊子

はじめに

RNAi (RNA interference; RNA干渉) 法は、細胞内に二本鎖RNAを取り込ませることにより、その配列と相補な配列を有するmRNAが分解され、その結果、標的とする遺伝子の機能を阻害した表現型を得るための手法です。植物の研究においては従来のアンチセンス法よりも発現抑制の効果が大きいことから、本法の利用が遺伝子研究の主流となっています。

私たちの研究グループではトマトを材料に、果実の成熟を制御するメカニズムの解明を目的として、転写因子遺伝子を標的とした研究を進めています。その過程で、新規に成熟の制御に関与することが見込まれる転写因子遺伝子 *FRUITFULL2* (*FUL2*) を見出しました。そこでこの転写因子遺伝子がどのように成熟に関与するのかを明らかにするために、RNAiを発現するベクターを構築、アグロ法により組換え植物体を作り出し、発現抑制を行うことにしました。その結果、組換えトマトの果実では、成熟期の特徴的な変化であるリコペンがほとんど生産されない、また成熟促進植物ホルモンであるエチレンの合成も大幅に抑制されるなど、成熟の進行が明確に抑制されました (図1)。

そこで今回、「KOD SYBR® qPCR Mix」を用いて遺伝子発現抑制の程度を検討したところ、RNAiによるmRNAの分解が生じるような場合には、従来のリアルタイムPCR用試薬よりも正確にインタクトなmRNAを定量できる可能性を見出しましたので、下記にその根拠となるデータをご紹介します。

方 法

1. *FUL2*発現抑制組換えトマトの作出とcDNAの調製

*FUL2*遺伝子の一部配列 (図2) を植物用RNAiベクターに組み込み、アグロ法によりトマトに導入しました。再分化した植物は組換え体用の栽培室で栽培し、果実を得ました。果実は開花後35日 (未成熟期)、45日 (桃熟期)、49日 (赤熟期) にサンプリングし、mRNAを調製、ランダム6-merをプライマーとして逆転写を行ってcDNAを合成しました。

2. リアルタイムPCR法による発現解析

KOD SYBR® qPCR Mixを用いて以下の条件にて発現解析を行いました。

①反応液組成		②PCRサイクル	
H ₂ O	1.6 μl	98°C 2 min.	40 cycles
KOD SYBR® qPCR Mix	10 μl	↓	
50 × ROX	0.4 μl	98°C 10 sec.	
2 μM Forward Primer	3 μl	58°C 10 sec.	
2 μM Reverse Primer	3 μl	68°C 1 min.	Melting curve step
Sample cDNA	2 μl	↓	
Total reaction volume	20 μl		

結果および考察

RNAiを導入する組換え実験から、明確に果実の成熟が抑制される植物体が複数得られました (図1)。これらについて、当初、通常の発現解析に用いるTHUNDERBIRD® qPCR Mixを用いて *FUL2*遺伝子の短い領域 (78 bp; 図2) を標的として解析したところ、発現の抑制は確認されましたが、ある程度のmRNAが存在しているという結果となりました (図3A)。

明確な果実のフェノタイプと比べて発現抑制の程度が少し小さいかもしれないと感じ、ノーザン解析を行ったところ、やはり、組換え体では全長mRNAは検出されませんでした (図3C)。そこで、長鎖配列でもリアルタイムPCR法による定量的な解析ができるというKOD SYBR® qPCR Mixを用いて、コード領域全長を増幅の標的として (図2、赤矢印) 解析したところ、組換え体では最初の実験と比べて1/5程度以下にmRNA量が評価され、ノーザン解析により近い結果となりました (図3B)。

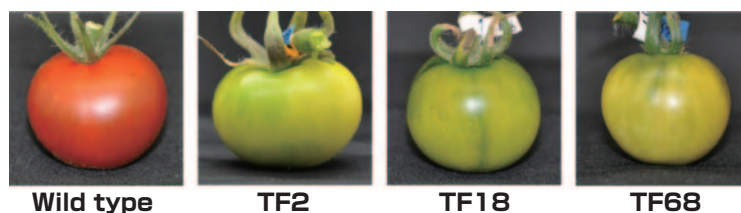


図1. *FUL2*遺伝子のRNAiベクター導入による形質転換トマトの果実
組換えトマト (TF2、TF18、TF68) は成熟が抑制されており、赤くなりません。

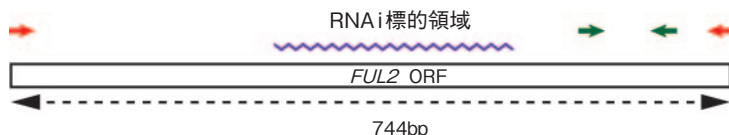


図2. *FUL2*遺伝子のコード領域
赤の矢印、緑の矢印はそれぞれKOD SYBR® qPCR Mix またはTHUNDERBIRD® qPCR Mixによる発現解析を行ったプライマーセット。

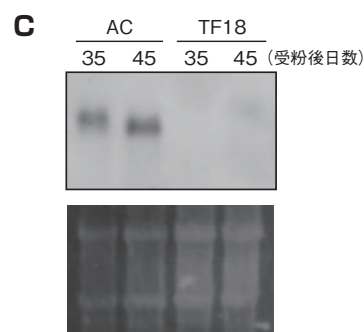
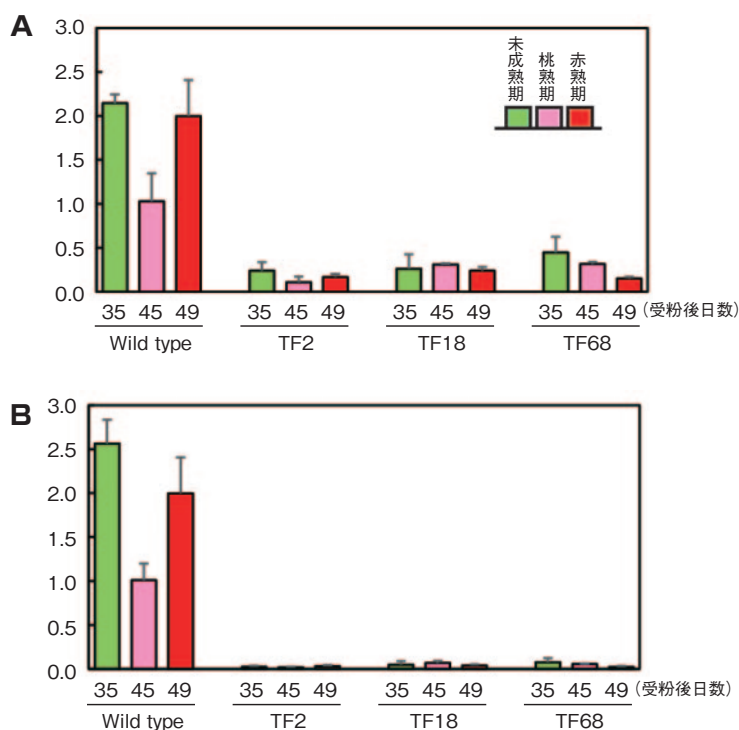


図3. 組換えトマト果実における*FUL2*遺伝子発現解析
A. THUNDERBIRD® qPCR Mixによる解析。
B. KOD SYBR® qPCR Mixによる解析。
C. ノーザンプロット法による解析 (上段)。下段は全RNAの泳動像。
開花時に受粉処理を行い、35、45、49日後の果実について三反復の平均値と標準偏差を示す。

これらの結果から考察すると、RNAiによるmRNAの切断が生じ、*FUL2*の多くの転写産物は機能を失っているが、部分断片が残存している状態が想定されます。短い領域を標的としたリアルタイムPCRでは、これらの断片化したRNA由来の逆転写産物も検出されるため、実際に機能を持つインタクトなmRNAの蓄積量よりも過大な量を検出してしまふと考えられます。一方、KOD SYBR® qPCR Mixを用いたコーディング領域全長によるPCRでは、これらの部分断片は検出されなかったため、正常なタンパク質に翻訳されるインタクトなmRNAの蓄積量を反映した結果が得られたと思われます。

このようなRNAiの研究においてだけでなく、種々の遺伝子において内在のsiRNAによる発現の微調整が行われている現象が近年盛んに研究されるようになっており、そのような場合の発現解析でも、部分断片の検出により実際の現象とのズレが生じてしまうことが想定されます。このように正常な機能を有するインタクトなmRNAを検出することが必要な発現解析の場合には、ノーザン解析あるいは半定量PCRに加え、KOD SYBR® qPCR Mixを用いたリアルタイムPCR解析は有効なツールであると思われます。

参考文献

Shima, Y., Fujisawa, M., Kitagawa, M., Nakano, T., Kimbara, J., Nakamura, N., Shiina, T., Sugiyama, J., Nakamura, T., Kasumi, T. and Ito, Y. (2014) Tomato FRUITFULL homologs regulate fruit ripening via ethylene biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, **78**, 231-237.



製品 KOD SYBR® qPCR Mix を用いた実施例

ChIPターゲットの効果的な増幅

従来のqPCR試薬で解析が困難だったChIP (Chromatin Immunoprecipitation) ターゲットについて、KOD SYBR® qPCR Mixを用いて解析した結果をお客さまよりご提供いただきましたのでご紹介いたします。

実験方法

サンプル ヒトゲノムDNA

サンプルの調製方法 QIAGEN社のQIAamp® DNA Mini Kitキットを用いて液体培養した細胞よりヒトゲノムDNAを精製した。

遺伝子名 転写制御領域

ターゲット長 202bp

プライマー配列 F: 塩基数20 Tm値70.1 GC% 65% R: 塩基数20 Tm値77.3 GC% 70%

反応液組成 KOD SYBR® qPCR Mix、A社リアルタイムPCR試薬は、共に以下の組成で実験を行った。

qPCR酵素mix	12.5 μ l
Primer F	0.5 μ l
Primer R	0.5 μ l
Template	1 μ l
DDW	10.5 μ l
反応液	25 μ l

PCRサイクル <KOD SYBR® qPCR Mix>

98°C 2min.

↓
(98°C 10sec., 60°C 10sec., 68°C 30sec.) × 40

↓
融解曲線解析 60°C to 95°C

<A社qPCRキット>

94°C 2min.

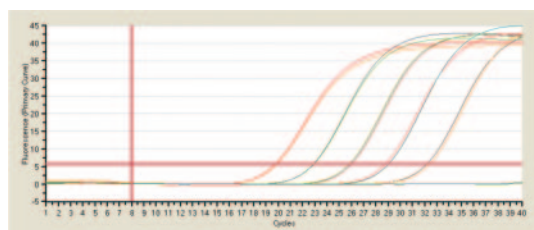
↓
(94°C 30sec., 55°C 30sec., 72°C 1min.) × 45

↓
融解曲線解析 60°C to 95°C

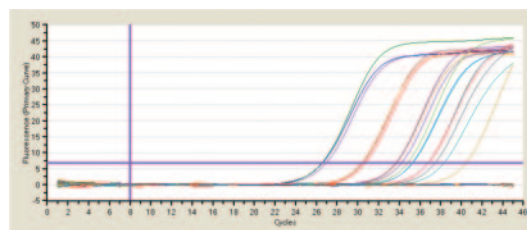
測定機器 TaKaRa Thermal Cycler Dice® Real Time System TP800

結果

各qPCR Mixの増幅曲線の比較



KOD SYBR® qPCR Mix



A社qPCRキット

先生からのコメント

これまで使ってきたqPCR MixでかからなかったPCRが、KODによって良好な結果が得られ、大変感謝しております。暗礁に乗り上げていた実験に光が見えてきたような気がしています。有難うございました。

TOYOBO

TOYOBO LIFE SCIENCEウェブサイトリニューアルのお知らせ



2015年4月1日にウェブサイトをリニューアルいたしました。もうご覧いただきましたでしょうか。

URL : <http://lifescience.toyobo.co.jp/>

トップページは、探そうとしている製品の入り口がどこにあるか一目でわかるように製品群別に写真や図を載せています。

各製品のページも一新して、カタログを見るような感覚でご覧いただけるよう配置し、実施例、関連製品などの情報の充実を図りました。

右上に検索窓を設け、トップページから製品を探すことができるようになりました。また、詳細検索のコーナーに入っただけで、Code No. キーワードで検索した結果をさらに対象別に絞り込むことも可能です。是非お試しください。

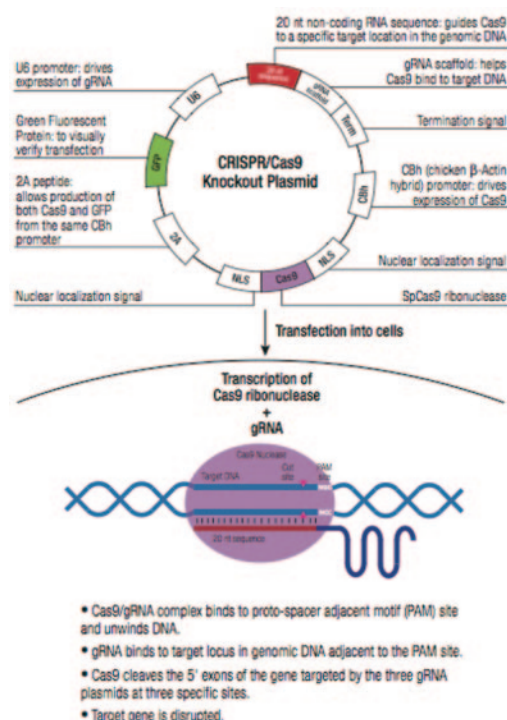


Santa Cruz Biotechnology CRISPR/Cas9 System

抗体およびその関連製品をはじめ、siRNA、化学品など幅広く取り扱っております Santa Cruz Biotechnology社より、CRISPR/Cas9 System が発売されました。

- ・ CRISPR/Cas9 ノックアウトプラスミドはCas9ヌクレアーゼと高効率なノックアウトが行えるよう設計された3種類のgRNAをコードしたプラスミドのプールから構成されています。
- ・ ヒト、マウス各18,000以上の遺伝子をターゲットとした製品をご用意。精製プラスミドDNAですので、すぐにトランスフェクションを行うことが可能です。
- ・ gRNA配列は、GeCKO (v2) ライブラリー由来です。

また、CRISPR/Cas9 ノックアウトプラスミドとコトランスフェクションを行ってDNA切断部位にピューロマイシン耐性遺伝子を組み込むことで、ノックアウトした細胞の選択が可能となる HDR (Homology-Directed Repair) プラスミド、選択後にピューロマイシン耐性遺伝子を除去するためのCre Vectorもご用意しております。



製品の詳細、検索はこちらのサイトからお願いいたします。

URL : http://www.scbt.com/research/crispr_cas9_knockout_plasmids.html

高効率・高成功率PCR酵素 KOD FX Neo

難配列・Long PCR・
クールドサンプルにお勧め

伸長性・クールドサンプルからの増幅性能が格段にアップしました。

KOD DNA polymerase*は、優れた伸長性を有し、クールド成分の阻害に強いといった特長を持っております。KOD FXは、この特性を利用して開発された高成功率PCR酵素であり、難配列やクールドサンプルからの増幅などに大好評いただいております。

しかし、KOD FXをはじめ従来のPCR酵素は20～30サイクル以降、増幅が持続しなくなる「プラトー現象」が生じ、PCR機能が完全には発揮できていませんでした。「KOD FX Neo」は、KOD FXの技術に、弊社で新たに開発した「伸長エンハンサー」などの技術を応用することで、「プラトー現象」を抑え、長いターゲットや難配列ターゲット、クールドサンプルなどからの増幅効率をさらに向上させることに成功しました。

* M. Takagi et al., Appl. Environ. Microbiol., **63** : 4504-4510 (1997)

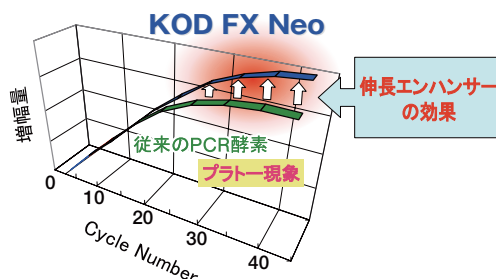


図1. 伸長エンハンサーの効果

特長1 優れたPCR性能

- ・ゲノムDNAを鋳型として最大40kbの増幅が可能。
- ・30sec./kbの高速サイクルを実現。(クールドサンプルでは1min./kbをお薦めしております)
- ・高GCターゲットなどの難配列の増幅に最適。

※正確性はTaq DNA Polymeraseの約11倍

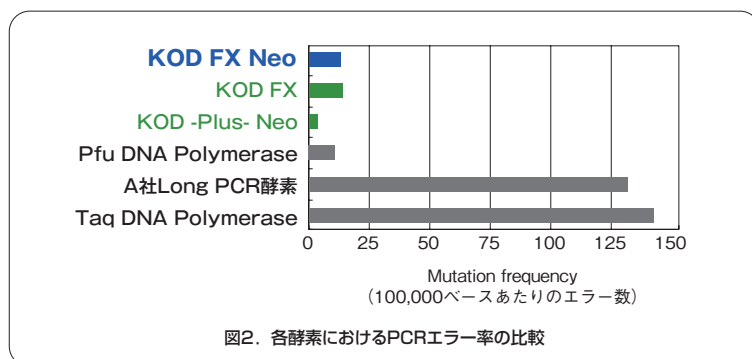


図2. 各酵素におけるPCRエラー率の比較

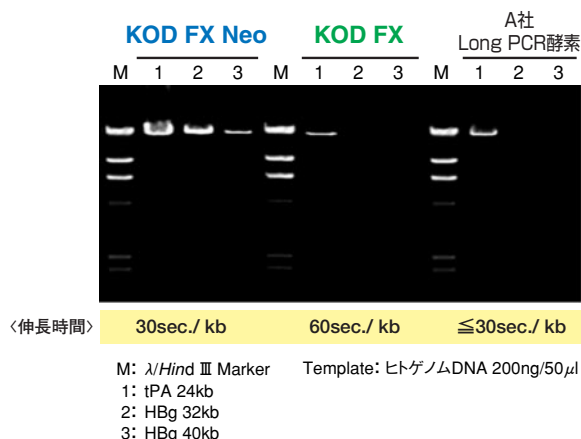


実施例1 増幅長の比較

KOD FX Neo及び従来品を用いて、ヒトゲノムDNAを鋳型に長鎖ターゲットの増幅を行いました。

その結果、KOD FX Neoを用いた場合のみ、今まで増幅が困難であった40kbの増幅を確認することができました。また、KOD FX Neoでは従来品に比べ、伸長時間を半分(30sec./kb)で行うことが可能です*。そのため、反応時間を大幅に短縮することができました。

*クールドサンプルでは1min./kbで実施することをお薦めしております。



【サイクル条件】

KOD FX Neo

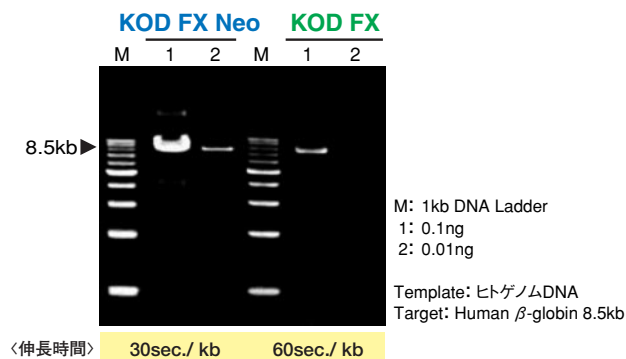
94℃, 2min.
98℃, 10sec. 5 cycles
74℃, 30sec./kb
98℃, 10sec. 5 cycles
72℃, 30sec./kb
98℃, 10sec. 5 cycles
70℃, 30sec./kb
98℃, 10sec. 5 cycles
68℃, 30sec./kb 20 cycles
68℃, 7min.
4℃, Hold

KOD FX

94℃, 2min.
98℃, 10sec. 5 cycles
74℃, 60sec./kb
98℃, 10sec. 5 cycles
72℃, 60sec./kb
98℃, 10sec. 5 cycles
70℃, 60sec./kb
98℃, 10sec. 5 cycles
68℃, 60sec./kb 20 cycles
68℃, 7min.
4℃, Hold

実施例2 検出感度の比較

ヒトゲノムDNAを鋳型として
検出感度の比較を行いました。
その結果、KOD FX Neoは、従
来品に比べ約一桁感度の向上を
認めました。



【サイクル条件】

KOD FX Neo

94°C, 2min.
98°C, 10sec. $\leftarrow$ 40 cycles
68°C, 4.5min.
4°C, Hold

KOD FX

94°C, 2min.
98°C, 10sec. $\leftarrow$ 40 cycles
68°C, 9min.
4°C, Hold

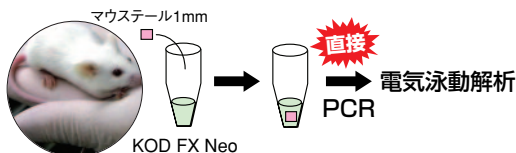
特長2 クルードサンプルからの増幅性能アップ

- ・ グラム陽性菌や酵母・カビなどの微生物、髪の毛・爪などの動物組織、哺乳類培養細胞や血液などからの直接PCRが可能です。
- ・ 従来品よりもPCR阻害物質に強く、土壌や食品などのよりクルードなサンプルからの増幅が可能です。
- ・ 植物ライセートやマウステールなどからの増幅効率が向上。

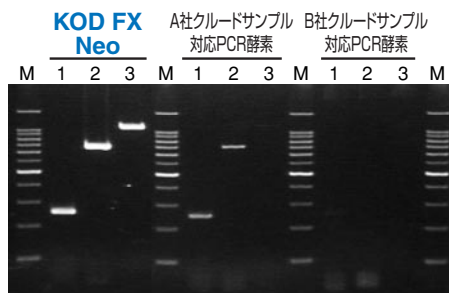
実施例3 マウステールの直接PCR

マウステールを直接PCR反応液に添加し、様々なPCR酵素で増幅を比較しました。その結果、KOD FX Neoを用いた場合のみ増幅を確認することができました。

このように、KOD FX Neoではサンプルを直接PCRに持ち込むことが可能であり、煩雑な精製を省略することが可能です。



*マウステールなど動物組織を直接増幅した場合、PCR産物がアガロースゲル電気泳動のウェルに残ることがあります。泳動する際は、PCR産物50 μ lに対し、20mg/ml Proteinase K 10 μ lを添加してから泳動することをお薦めします。



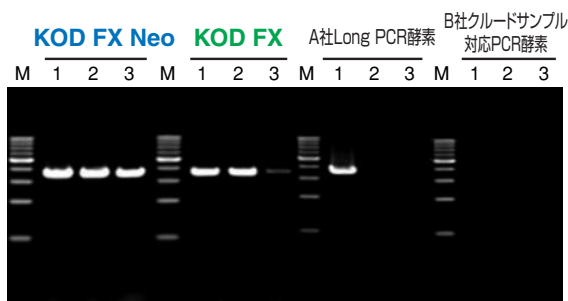
【サイクル条件】

94°C, 2min.
98°C, 10sec. $\leftarrow$ 30 cycles
68°C, 1min./kb
4°C, Hold

M: 200 bp DNA Ladder
1: Mouse TATA box binding protein (TBP) 0.5 kb
2: Mouse transferrin receptor (Tfr) 1.5 kb
3: Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) 2.6 kb

実施例4 フミン酸添加実験

フミン酸 (humic acid) とは、腐植土や土壌などに存在する赤褐色または黒褐色の有機物であり、PCRを阻害することが知られています。通常行われるDNAの精製ではこのフミン酸は除くことはできません。そのため、環境・生態系サンプルを鋳型としたPCRはとても難しいとされています。ここでは、例としてヒトゲノムDNAにフミン酸を混合し、PCRの阻害に関する評価を行いました。その結果、KOD FX Neoが最もフミン酸の阻害に強い傾向を示しました。KOD FX Neoを用いれば環境・生態系のサンプルからでもPCRが可能であると考えられます。



M: 1kb DNA Ladder
1: フミン酸添加量* 0 μ l
2: フミン酸添加量* 2 μ l
3: フミン酸添加量* 4 μ l

Template: 10ngヒトゲノムDNA
Target: Human β -globin 3.6kb

*フミン酸: OD280=1の溶液を使用

【サイクル条件】

94°C, 2min.
98°C, 10sec. $\leftarrow$ 30 cycles
68°C, 4min.
4°C, Hold

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率・高成功率PCR酵素 KOD FX Neo ・ KOD FX Neo (1.0U/ μ l) ・ 2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX Neo ・ 2mM dNTP	200U $\times$ 1本 [200回用]*	-20°C	KFX-201	¥35,000
	(200U $\times$ 1本) $\times$ 5 [1,000回用]*	-20°C	KFX-201X5	¥140,000
	(200U $\times$ 1本) $\times$ 10 [2,000回用]*	-20°C	KFX-201X10	¥260,000

関連商品

*50 μ l反応を行ったときの反応回数で表示しています。

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率TAクローニングキット (KOD用) TARGET Clone™-Plus-	10回用	-20°C	TAK-201	¥16,000

KOD FX Neoによって増幅されたDNAの末端は平滑化されていますので、末端を制限酵素処理するか、平滑末端クローニングの手法を用いてクローニングを行う必要があります。また専用のTAクローニングキット「TARGET Clone™-Plus- (Code No. TAK-201)」を用いることで増幅産物に直接Aを付加し、そのまま容易にTAクローニングを行うことができます。

高成功率PCR酵素「KOD FXシリーズ」を用いた植物種子からの簡便な増幅例

東洋紡（株） 敦賀バイオ研究所 小林 哲大

はじめに

植物遺伝子のスクリーニングにおける簡便な増幅方法として、植物サンプルを前処理して得られるライセートをテンプレートとしたPCRを行う方法が盛んに行われています。しかし種子の場合は固い種皮を持つため、DNAを溶出させることが困難であり、さらに種類によっては多糖などのPCR阻害物質を多量に含むため、ライセートを用いるPCRは難しいとされてきました。

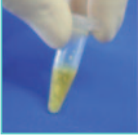
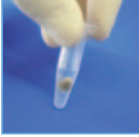
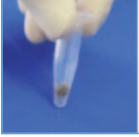
そこで今回、クルードサンプルの増幅に優れるPCR酵素「KOD FXシリーズ」を用い、硬い種皮を有し、PCR阻害物質を多く含むことが知られているワタの種子の効果的なライセートの調製方法と高効率な増幅について検討を行いました。

さらに、その方法をニンジン、ホウレンソウ、ブドウなど様々な植物種の種子の遺伝子解析に応用する検討も行いました。以下、ご紹介いたします。

方 法

(1) 種子ライセートの調製（ワタ種子）

破砕法（改良法）、ワンステップ法、X社PCRキット添付の前処理液を比較しました。

破砕法（改良法）	ワンステップ法	X社PCRキット前処理法
 1粒のワタ種子を ハンマーで砕き マイクロチューブへ* ①	 1粒のワタ種子を マイクロチューブへ ①	 1粒のワタ種子を マイクロチューブへ ①
 Buffer A** 500μl添加 Buffer A 100mM Tris-HCl (pH9.5) 1M KCl 10mM EDTA ②	 Buffer A** 500μl添加 Buffer A 100mM Tris-HCl (pH9.5) 1M KCl 10mM EDTA ②	 キット添付の Dilution Buffer 100μl 添加後、3分放置 ②
 95℃ 5分 ↓ Vortexにて良く攪拌 ③	 95℃ 5分 ↓ Vortexにて良く攪拌 ③	 上清1μlを各PCR 反応液に添加 ③
 上清1μlを各PCR 反応液に添加 ④	 上清1μlを各PCR 反応液に添加 ④	

* 複数の種子を処理する場合は、コンタミネーションを防ぐため種子をラップなどで包んでから砕くことをお勧めします。

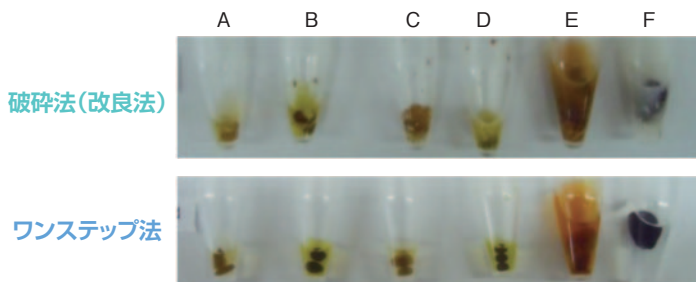
**参考文献: *Bio Techniques*, 19:394 (1995)

(2) 様々な種子からのDNA溶出

様々な種子で破砕法とワンステップ法を比較しました。

種子の大きさに応じてBufferAの量を調整（種子が浸る程度のBuffer量で実施）し、溶出方法は上記と同様に行いました。

	種子名	種子数	BufferA量
A	ニンジン	2粒	100μl
B	キャベツ	2粒	100μl
C	ホウレンソウ	2粒	100μl
D	ハクサイ	3粒	100μl
E	ブドウ	1粒	200μl
F	ナシ	1粒	200μl



(3) PCR**【反応液組成】**

PCR grade water	10 μ l
2 $\times$ PCR Buffer	25 μ l
2mM dNTPs	10 μ l
10pmol/ μ l Primer #1	1.5 μ l
10pmol/ μ l Primer #2	1.5 μ l
KOD FX or KOD FX Neo	1 μ l
溶出液上清	1 μ l
Total reaction volume	50 μ l

※X社PCRキットは取扱説明書推奨の条件にてPCRを実施し比較を行いました。ただし、サイクル条件は40サイクルで行いました。

【サイクル条件】

94 $^{\circ}$ C, 2 min.
 98 $^{\circ}$ C, 10 sec. $\leftarrow$ 40 cycles
 68 $^{\circ}$ C, 1 min./kb
 4 $^{\circ}$ C, Hold

〈ワタ種子〉

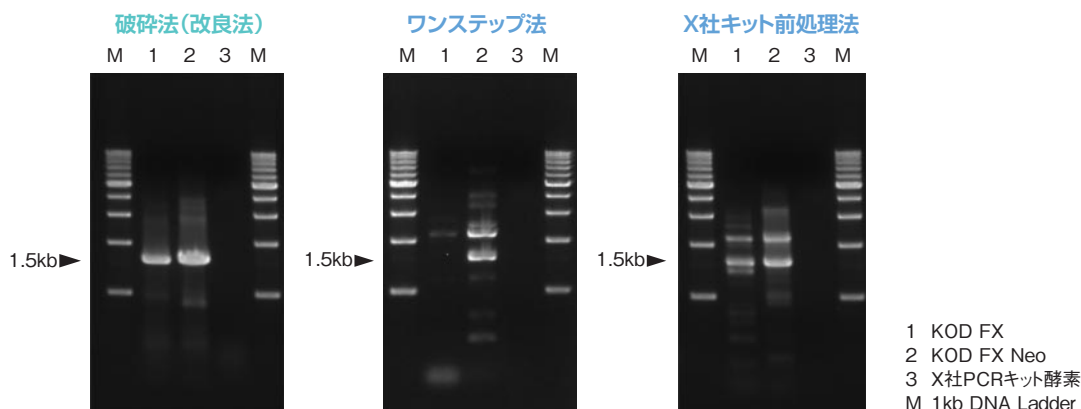
ターゲット：gibberellin 20-oxidase 1.5kb
 Primer #1：TGCTTCCATCAACTGCTGCTGT
 Primer #2：TCAGCACGGTAATGGTTCTGTGTG

〈その他種子〉

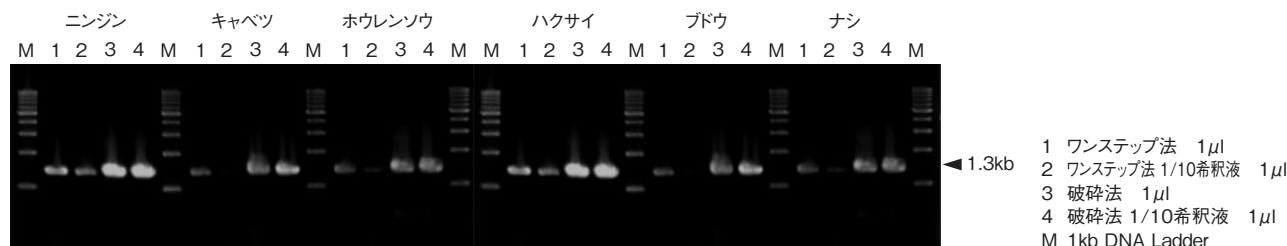
ターゲット：rbcL 1.3kb
 Primer #1：ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
 Primer #2：AAGCAGCAGCTAGTTCCGGGCTCCA

結果および考察

今回行った3種類の調製法のうち、破碎法を用いた場合でのみ種皮を破壊することができ、結果的に種子内部の胚や胚乳の成分を含んだライセートを調製することが可能でした。一方、他の手法では種皮を破壊することができず、主に種子表面の成分のみを含むライセートが得られる結果となりました。

(1) ワタ種子からの増幅

PCR産物5 μ lを1%アガロースゲルにて解析した結果、KOD FXシリーズを用いたもののみに目的遺伝子の増幅を認めることができました。特に、破碎法のライセートを用いた場合に特異性の高い良好な結果を得ることができました。他の方法のライセートを用いた場合、原因不明の非特異バンドが生じましたが、これはライセートが胚や胚乳の成分を含まなかったことに起因している可能性があります。

(2) 様々な種子からの増幅

次に、ワタの実験で最も良好な増幅を示したKOD FX Neoを用い、野菜や果物計6種類の種子を破碎法とワンステップ法で調製したライセートからの増幅を試みました。その結果、すべての植物種において、破碎法の方が良好な結果が得られ、破碎法を用いるライセート調製法は様々な種子に応用できることが分かりました。

まとめ

植物種子は、硬い種皮に覆われ、さらに多糖などのPCR阻害物質を多く含むため、ライセートを用いるPCRは不向きとされてきましたが、破碎法とKOD FX シリーズを用いることにより様々な種子を用いて簡便に遺伝子解析が可能となることが分かりました。

新発売 **40%off**
キャンペーン

マルチプレックスPCR・バイサルファイト処理DNA用 高正確性PCR酵素

KOD -Multi & Epi-™

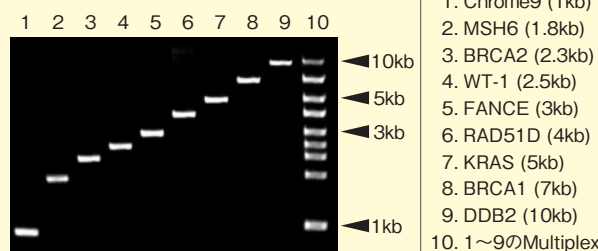
【期間:2015年9月7日～
2016年3月18日(ご注文分)】

マルチプレックスPCRおよびバイサルファイト処理DNAの増幅に最適なPCR酵素です。
 改変型KOD DNA Polymeraseと伸長アクセラレーターの使用で、よりバイアスの少ない増幅や、
 ウラシルを多く含むテンプレートからの増幅が可能になりました。



1～10kbのターゲット長のマルチ
 プレックスPCRと各Primerによる
 シングルプレックスPCRを行い、電気
 泳動で確認しました。

その結果、本製品を用いたマルチ
 プレックスPCRではシングルプレ
 ックスPCRを行った場合と同様に増幅
 されていることが確認できました。



⇒本誌p.1～4に詳細記事がございます。

遺伝暗号クイズ

DNA

5' A [] [] [] [] [] [] T [] [] [] [] [] [] [] [] [] [] 3'

3' [] [] C G [] A [] C [] [] [] G [] [] C [] [] [] T A A [] [] T 5'

mRNA

5' [] U [] [] [] [] [] A [] [] [] [] [] [] [] [] [] A 3'

Protein

[] H [] [] [] W [] *

4 8 3 2 9 (終止コドン)



**プレゼント
付き**

クイズの解答に加え、
 UPLOADのアンケート
 (下記クイズコーナーに記載)
 にご回答いただいた方から
 抽選で、5名様に2,000円分
 の図書カードまたはアマゾン
 ギフト券をご進呈いたします。

遺伝暗号を解読してマスを埋め、黄色のマスを数字の順に並べてくだ
 さい。コドン表は下記のクイズコーナーのページにございます。

ヒント このタンパクは塩基性アミノ酸を各1つ含みます。

答え

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

ご応募はこちらから

1 弊社ウェブサイト
<http://lifescience.toyobo.jp>

2 クイズコーナー

※ご応募期間 2015年9月25日～2015年11月30日 <http://lifescience.toyobo.co.jp/page/quiz/>

TOYOBO
 Ideas & Chemistry

東洋紡株式会社

◆◆ 納期・注文に関するお問い合わせ ◆◆

ライフサイエンス事業部 (大阪)

〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
 TEL.06-6348-3786 FAX.06-6348-3833
 E-mail order_lifescience@toyobo.jp

ライフサイエンス事業部 (東京)

〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号
 住友商事京橋ビル
 TEL.03-6887-8819 FAX.03-6887-8951
 E-mail order_lifescience@toyobo.jp

◆◆ 製品内容・技術に関するお問い合わせ ◆◆

テクニカルライン

TEL.06-6348-3888 FAX.06-6348-3833
 開設時間 : 9:00～12:00 13:00～17:00
 (土・日・祝を除く)
 E-mail tech_osaka@toyobo.jp
 [URL] <http://lifescience.toyobo.co.jp>

**PCRは
東洋紡**